



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Российской Федерации

(14) Дата публикации: 1994.12.15

(21) Регистрационный номер заявки: 4915763/04

(22) Дата подачи заявки: 1991.03.04

(45) Опубликовано: 1994.12.15

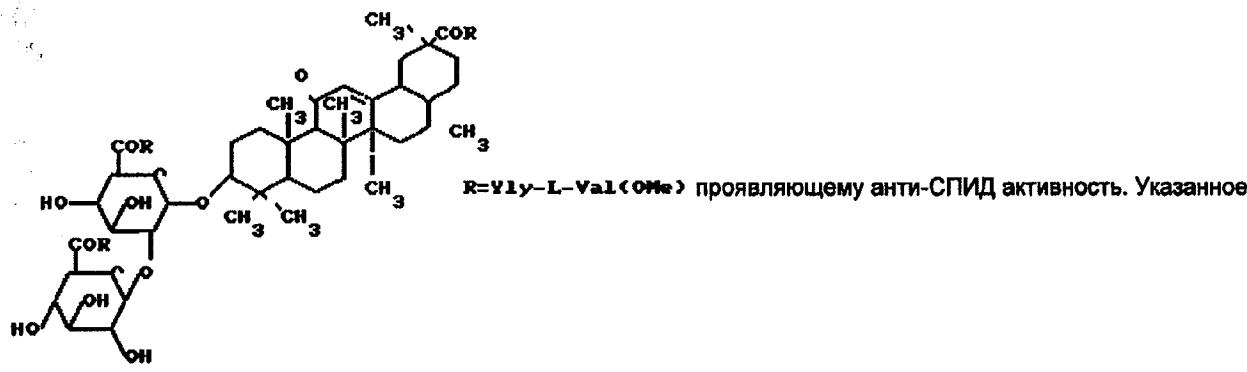
(56) Аналоги изобретения: AJDS Experimental Treatment Directory v.2.N3.1988. Jto M., Nakashima H., Baba M., Rauwels R., De clerg E., Shigeta S., Jamamoto N. Antiviral Res. 1987, N7, P.127-137. De Clerg E. Trends Pharmacol. Oscl. 1987.V.8.P.339-345. Nakashima H., Jamamoto N., Baba M., Shigeta S. Заявка N 255420 (ЕПВ), 1988 кл. A 61K 31/70. JV International Conference on AJDS. Stockholm, Sweden. 1988, Abstract N3534. Jto M., Sato A., Hirabayashi K., Tanabe F., Shigeta S., Baba M., de Clerg E., Nakashima H., Jamamoto N. Antiviral Res. 1988. V.10.P.289-298. Perre C.F. et al J. Exp. Med. 1988.V.188.P.1111-1125. AJDS/HJV Experimental Treatment Directory.1988.v2.p.31-51.

(54) ГЛИКОПЕПТИД β -ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ С МЕТИЛОВЫМ ЭФИРОМ ГЛИЦИЛ-L-ВАЛИНА, ПРОЯВЛЯЮЩИЙ АНТИ-СПИД-АКТИВНОСТЬ

Использование: в качестве средства с анти-СПИД-активностью. Сущность: продукт: 3-O-[2-O- β -D-глюкопиранозилураноил]- β -D-глюкопиранозилураноил]-(3 β , 20 β)-11,30-диоксо-30-(N-6-аминоурацил)-30-норолеан-12-ен, выход 98,9% БФ $C_{46}H_{65}N_3O_{17}$, т.пл. 261 - 264°C. Вещество способно эффективно ингибировать репродукцию ВИЧ-1 в культуре клеток. 1 табл.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к новому биологически активному соединению, конкретно, к гликопептиду β -глицирризиновой кислоты с метиловым эфиром глицил-L-валина: 1-O-[(3 β , 20 β)-11-оксо-20-оксо-20-(N-глицил-L-валина метиловый эфир)-30-норолеан-12-ен-3-ил]-2-O-[\mathbf{\beta}-D-6-оксо-6-дезокси-6-(N-глицил-L-валина метиловый эфир)-глюкопиранозил-\mathbf{\beta}-D-6-оксо-6-дезокси-6-(N-глицил-L-валина метиловый эфир)-пиранозид формулы (I)]



В настоящее время во всем мире интенсивно проводятся исследования по поиску средств лечения СПИДа. Известно уже более 50 препаратов, подавляющих репродукцию вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) *in vitro* [1]. Одним из таких препаратов является глицирризиновая кислота (ГК) - активное начало экстракта солодки [2-6]. Установлено, что введение ГК в высоких дозах (800-1600 мг/день) больным СПИДом вызывает у них увеличение содержания ТЧ лимфоцитов и снижение количества вирусного антигена [5]. Механизм антивирусного действия ГК до настоящего времени остается неустановленным. Однако, ГК малоэффективна как ингибитор репликации ВИЧ на хронически инфицированных клетках.

Целью изобретения является поиск нового соединения в ряду производных β -глицирризиновой кислоты, обладающих анти-СПИД активностью.

Поставленная цель достигается гликопептидом β -глицирризиновой кислоты формулы (I), проявляющим анти-СПИД активность.

Фармакологические свойства соединения I.

Противовирусная активность соединения I была изучена на модели первично инфицированных ВИЧ-1 лимфоидных клеток MT-4. Раствор препарата в ДМСО (20 мг/мл - 50 мг/мл) вносили в суспензию инфицированных ВИЧ-1 клеток до конечной концентрации препарата 100-1000 мкг/мл. ДМСО до конечной концентрации 0,5-2,0%. В предварительных опытах было показано, что ДМСО в концентрациях 0,5-2,0% не блокирует репродукцию ВИЧ-1. Об ингибировании репродукции ВИЧ-1 в клетках судили по снижению активности обратной транскриптазы и снижению накопления вирусного антигена (методом иммуноферментного анализа) в культуральной жидкости на 4 сутки культивирования по сравнению с контролем (без добавления препарата). В качестве референс-препараторов использовали один из наиболее эффективных для лечения СПИДа препаратов - азидотимидин (АЗТ), механизм действия которого связан с блокированием вирусной обратной транскриптазы и терминированием синтеза вирусной ДНК [7], и β -

глицирризиновую кислоту (β -ГК), эффективно ингибирующую репродукцию ВИЧ-1 в клетках. Основным недостатком АЗТ является его высокая токсичность [8]. Установлено, что исследованное соединение (I) эффективно ингибирует репродукцию ВИЧ-1 в культуре клеток в концентрации от 0,1 до 1,0 мг/мл. Противовирусная активность соединения (I) аналогична активности АЗТ и β -ГК (ингибирование на 98-99%). В разведении 100 и 250 мкг/мл гликопептид (I) подавляет репликацию ВИЧ-1 эффективнее β -ГК. Соединение (I) менее токсично для культуры клеток, чем АЗТ. Снижение концентрации препарата приводит к уменьшению токсического воздействия на культуру клеток.

Гликопептид (I) менее токсичен, чем АЗТ. LD_{50} гликопептида (I) \approx 8000 мг/кг.

Данное соединение относится к классу малоопасных веществ.

Синтез гликопептида (I) проводили дициклогексилкарбодиимидным методом пептидного синтеза без предварительной защиты OH-групп углеводной части молекулы гликозида. Выход гликопептида (I) составил 49%. Аналитически чистый продукт получали путем перекристаллизации из смеси ацетона-тексана (45%).

Таким образом, предложено новое малоопасное производное β -глицирризиновой кислоты - гликопептид (I), эффективно ингибирующий репродукцию ВИЧ-1 *in vitro* (в культуре клетка МТ-4), менее токсичный, чем азидотимидин, обладающий анти-СПИД активностью, аналогичной активности АЗТ и β -ГК.

При мер 1. Изучение анти-СПИД активности.

Противовирусная активность представленного гликопептида (I) была изучена на модели первично инфицированных ВИЧ-1 лимфоидных клеток МТ-4. Раствор препарата в ДМСО (20 - 50 мг/мл) вносили в суспензию инфицированных ВИЧ-1 клеток до конечной концентрации препарата 100-1000 мкг/мл, ДМСО до конечной концентрации 0,5-2,0%. В предварительных экспериментах было установлено, что ДМСО в концентрациях 0,5-2,0% не блокирует репродукцию ВИЧ-1. Об ингибировании репродукции ВИЧ в клетках судили по снижению активности обратной транскриптазы и снижению накопления вирусного антигена (методом иммуноферментного анализа) в культуральной жидкости на 4 сутки культивирования по сравнению с контролем (без добавления препарата). Для сравнения использовали один из наиболее эффективных для лечения СПИДа препаратов - азидотимидин (АЗТ), механизм действия которого связан с блокированием вирусной обратной транскриптазы и терминированием синтеза вирусной ДНК, и β -глицирризиновую кислоту (β -ГК), эффективно ингибирующую репродукцию ВИЧ-1 в клетках. В таблице 1 приведены результаты проведенных экспериментов. Установлено, что исследованное соединение (I) эффективно ингибирует репродукцию ВИЧ-1 в культуре клеток в концентрациях от 0,1 до 1,0 мг/мл. По антивирусной активности (анти-ВИЧ) соединение I аналогично АЗТ и β -ГК (ингибирование на 98,1-98,9%). Следует отметить, что в концентрациях 100 и 250 мкг/мл соединение I подавляет репликацию ВИЧ-1 эффективнее β -ГК.

Соединение I менее токсично для культуры клеток, чем АЗТ, причем снижение концентрации препарата приводит к уменьшению токсического воздействия на культуру клеток. Данные приведены в таблице.

Пример 2. Получение гликопептида (I).

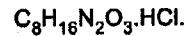
а) Гидрохлорид метилового эфира глицил-L-валина -Gly-L-Val (OMe).HCl (1а)

К суспензии 5 г (28,7 моль) Gly-L-Val (Reanal) в 200 мл сухого метанола прибавляют по каплям 20 мл перегнанного хлористого тионила при охлаждении в ледяной бане и перемешивают 2 ч до растворения осадка, выдерживают 24 ч при комнатной температуре, упаривают растворитель в вакууме при температуре 30°C, образовавшийся сироп обрабатывают сухим эфиром и сушат в вакууме до постоянного веса.

Выход 3,0 г (46,6%).

$$[\alpha]_D^{20} = -87,5^\circ \text{ (c = 0.02; 40% EtOH)}$$

Найдено, %: C 41,97; H 7,27; N 11,94; Cl 15,42.



Вычислено, %: C 42,75; H 7,63; N 12,46; Cl 15,80.

б) Гликопептид β -глицирризиновой кислоты с метиловым эфиром глицил-L-валина (I)

К раствору 1,64 г (2 ммоль) β -глицирризиновой кислоты (92-95%) в 50 мл сухого ДМФА при охлаждении в ледяной бане прибавляют 1,5 г (7 ммоль) Gly-L-Val (OMe).HCl (1а), 1,4 г (6,5 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида и по каплям 5 мл сухого пиридина, перемешивают смесь при охлаждении 1 ч, выдерживают при комнатной температуре 48 ч с периодическим перемешиванием. Отфильтровывают осадок дициклогексилмочевины, фильтрат выливают в 400 мл холодной воды, подкисленной лимонной кислотой, отфильтровывают белый осадок, промывают его водой, высушивают. Получают 1,3 г (48,7%) гликопептида (I), который перекристаллизовывали из смеси ацетона-гексана. Выход гомогенного по ТСХ продукта 1,2 г (44,9%). R(f) = 0,45 (хлороформ-метанол-вода = 45 : 10 : 1), 0,33 (хлороформ-спирт = 7 : 1). $[\alpha]_D^{20} = +25^\circ \text{ (c = 0,03, метанол). т.пл. } 169\text{-}171^\circ\text{C.}$

ИК, ν , см⁻¹: 3600-3200 (OH, NH); 1740 (COOMe), 1660 (C₁₁ = O), 1580, 1530 (CONH).

УФ, λ_{max} MeOH (lg E) : 249 нм (3,95).

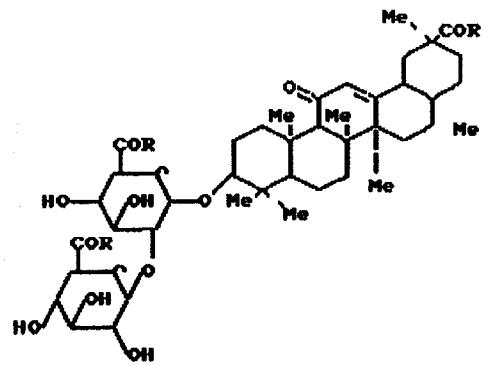
Найдено, %: C 60,20; 48,21; N 6,44.



Вычислено, %: C 59,44; H 7,86; N 6,30.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Гликопептид β -глицирризиновой кислоты с метиловым эфиром глицил-L-валина



где R - Gly - L - Val(OMe),

проявляющий анти-СПИД-активность.

ИЗВЕЩЕНИЯ К ПАТЕНТУ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

Код изменения правового статуса **ММ4А - Досрочное прекращение действия патентов РФ из-за неуплаты в установленный срок пошлин за поддержание патента в силе**
Дата публикации бюллетеня **2002.03.10**
Номер бюллетеня **07/2002**

РИСУНКИ

Влияние гликопептида (I) на репродукцию ВИЧ-1 в культуре клетки

Препараторы	Концентрация препарата, мкг/мл	Количество живых клеток, %	Ингибирование, %	
			активности вирусной обратной транскриптазы	накопления вирусного антигена
Азидотимидин	10	6,00±2,00	98,08±0,11	94,17±0,32
β-Глицирризиновая кислота	1000	11,40±7,80	99,30±0,10	-
-"-	500	18,20±9,00	98,20±0,20	98,30±0,82
-"-	250	-	96,90±0,20	93,90±0,86
-"-	100	26,00±12,10	89,90±5,90	57,70±0,92
ГК + Jly-L-Val(OMe)	1000	9,83±5,48	98,93±0,10	-
(I)	500	11,94±2,17	98,83±0,07	98,21±0,05
-"-	250	20,17±5,11	98,89±0,07	98,08±0,07
-"-	100	22,96±11,33	98,06±0,23	-
Контроль (неинфицированные клетки MT-4)	-	38,49±3,68	-	-
Контроль (инфицированные ВИЧ клетки MT-4)	-	35,49±2,35	0	0

DELPHION

[RESEARCH](#)[PRODUCTS](#)[INSIDE DELPHION](#)[SEARCH](#) [WORKFILE](#) [POWERSEARCH](#)[My Account](#)

Search: Quick/Number Boolean Advanced Der

The Delphion Integrated View: INPADOC Record

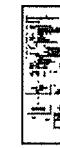
Buy Now: PDE | [File History](#) | [Other choices](#)Tools: Add to Work File: Create new WView: Jump to: [Top](#)[Go to: Derwent](#)

>Title: RU2024542C1: GLYCOPEPTIDE OF BETA-GLYCRRHIZIC ACID WITH GLYCYL-L-VALINE ETHER SHOWING ANTI-AIDS-ACTIVITY

Derwent Title: Glycopeptide of beta-beta-glycrrhizic acid and L-valine methyl ester - has anti-SPID activity, less toxicity than azidotimidine, and inhibits replication of HIV-1 virus in MT-4 culture cells [Derwent Record]

Country: RU Russian Federation

Kind: C1 Patent



Inventor: BALTINA LIDIYA A; Russian Federation
POKROVSKIY ANDREJ G; Russian Federation
PLYASUNOVA OLGA A; Russian Federation
TOLSTIKOV GENRIKH A; Russian Federation

Assignee: INSTITUT ORGANICHESKOJ KHIMII RAN Russian Federation
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 1994-12-15 / 1991-03-04

Application Number: RU1991004915763

IPC Code: Advanced: [C07J 53/00](#); [C07J 63/00](#); Core: more...
IPC-7: [A61K 31/705](#); [C07J 53/00](#); [C07J 63/00](#);

ECLA Code: None

Priority Number: 1991-03-04 SU1991004915763

Family:

Buy PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
<input checked="" type="checkbox"/>	RU2024542C1	1994-12-15	1991-03-04	GLYCOPEPTIDE OF BETA-GLYCRRHIZIC ACID WITH GLY VALINE METHYL ETHER SHOWING ANTI-AIDS-ACTIVITY

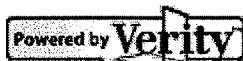
1 family members shown above

Other Abstract Info:

None



Nominate this for the Gallery...



THOMSON

Copyright © 1997-2006 Thomson

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)